

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520081153427

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

血管生成素-1 基因修饰内皮祖细胞移植在
损伤血管内皮修复中的作用研究

The study of Angiopoietin -1 gene-modified
endothelial progenitor cells transplantation in repairing
rat balloon injury artery

韩潇

指导教师姓名: 王挹青 教授

专 业 名 称: 心血管病学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩日期: 2011 年 5 月

2011 年 5 月

血管生成素-1 基因修饰内皮祖细胞移植在修复大鼠球囊损伤血管中的作用研究

韩潇

指导教师 王挹青 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的： 体外培养大鼠血管生成素-1 (Angiopoietin-1, Ang-1) 基因修饰内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC), 即(Ang-1-EPCs)。构建股动脉球囊损伤的大鼠模型。探讨 Ang-1 基因修饰的 EPCs 对大鼠急性球囊损伤动脉血管的修复作用。

方法：大鼠股动脉经球囊损伤后 2 天, 扫描电镜观察其内皮损伤情况。动物实验分三组: 对照组、单纯损伤组、细胞移植组; 细胞移植组包括 EPCs 移植组 (n=16), PNL-EPCs 移植组 (n=16) 及 Ang1-EPCs 移植组 (n=16)。通过血管外膜下直接注射移植基因修饰的 EPCs。2 周时处死部分动物取出股动脉组织并收集外周血, 流式细胞技术测定 CD34 阳性细胞比例, 评价其骨髓动员的程度。ELISA 检测各组血清 Ang-1 的含量, HE 染色检测各组动脉内膜/中层比差别, PCNA 免疫组化观察平滑肌细胞增殖效应, Real-Time PCR 定量分析股动脉组织中 Ang-1/Tie-2 的 mRNA 含量; 4 周时取股动脉组织, 荧光显微镜观察 EGFP (+) 细胞, VIII 因子免疫荧光观察 Ang-1-EPCs 的分化情况。

结果: 1. 大鼠股动脉球囊损伤模型建立: 经球囊损伤后, 扫描电镜观察有明显内皮剥脱。在单纯球囊损伤组, 2 周石蜡切片 HE 染色见明显的新生内膜增殖, 血管腔明显变狭窄。PCNA 组化染色发现中膜和新生内膜有较多 PCNA 阳性细胞; 2. 基因修饰 EPCs 移植对新生内膜的增生程度的影响: 经 EPC 移植干预后, 中膜和新生内膜中 PCNA 阳性细胞比例减低, 其中 Ang-1-EPCs 减低最明显, 提示 Ang-1 修饰的 EPCs 移植干预有抑制大鼠球囊损伤血管后新生内膜增殖的效果; 3. 基因修饰 EPCs 移植对损伤血管内皮修复的作用: Ang-1-EPCs 明显上调外周血中 CD34 阳性细胞比例 ($P < 0.05$) 及 Ang-1 含量 ($P < 0.05$); 且 Ang-1-EPCs 移植组股动脉组织中 Ang-1 的 mRNA 含量也明显上升; 4 周时, VIII 因子免疫荧光提示 EPCs 可分化成具有内皮细胞标志的细胞系。

结论: Ang-1 基因修饰的 EPC 可以减缓球囊损伤的动脉血管的狭窄。

关键词: 内皮祖细胞 血管生成素-1 内皮损伤 修复

Abstract

Objective: Acquiring Angiopoietin-1 (Ang1) gene-modified endothelial progenitor cells (EPCs) (Ang-1- EPCs) in vitro, which were then transplanted in the animal model, for studying the effect of Ang-1 therapeutic efficiency and feasibility of Ang-1-epc transplantation in a rat artery balloon injury model.

Method: The SD rats femoral artery balloon injury model was established by denuding the rat right femoral arterial endothelium. Observation of the scanning electron microscope 2-days post surgery confirm the validity of the model. Rats were randomly assigned to one of three experimental groups (control group, balloon-injury group, cell-transplanted group); Cell-transplanted group consists of EPCs group, PNL-EPCs group and Ang1-EPCs group, $n=16$, each group. Two weeks after Ang-1- EPCs were transplanted in the injury lumen, animals were executed for collecting the tissue and blood. We measured the proportion of CD34 positive cells by flow cytometry to evaluate the degree of bone marrow mobilization and detected the levels of serum Ang-1. HE staining and PCNA immunohistochemistry staining were used to assess the histological change in injury lumen. Levels of angiopoietin (Ang)-1/Tie-2 were examined in the peritoneum by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR); Four weeks after transplantation, anti-VIII immunofluorescence staining was used to reflect the differentiation of donor Ang-1-EPCs.

Result: 1. Construction of rat femoral artery balloon injury model: injury endothelium was observed by scanning electron microscope. At 2 weeks after balloon angioplasty HE showed that endothelia was completely depleted and lumen stenosis was significant. A large number of positive cells were observed, and PCNA expression in the neointimal intima and increased statistically in the injury group. These results reflect the main proliferation of cellular components is smooth muscle cells. 2. The effect of gene-modified EPCs transplantation on neointimal hyperplasia: Ang-1-EPCs transplantation exhibited a beneficial effect by significantly inhibiting neointimal hyperplasia after balloon injury, which was most apparent with reduction in the conventional measure for hyperplasia intimal area and the I/M ratio. Moreover, expression of PCNA, which mainly reflects proliferation of VSMC in hyperplasia intima, was significantly lowered. 3. The effect of gene-modified EPCs transplantation

on neointimal hyperplasia: Ang-1-EPCs significantly upregulate the proportion of CD34 positive cells ($P < 0.05$) in peripheral blood and the level of Ang-1 ($P < 0.05$); and Ang-1 mRNA level of femoral artery tissue in Ang-1 transplantation group also significantly increased; At 4 weeks VIII factor immunofluorescence indicated that EPCs can differentiate into cells with endothelial cell marker.

Conclusions: Angiopoietin-1 (Ang1) gene-modified endothelial progenitor cells could slow down the balloon injury arterial stenosis.

Keywords: endothelial progenitor cell; Angiopoietin-1; endothelial injury; repair

目 录

摘要	I
Abstract	II
第一章 前言	1
1.1 血管生成素-1 的生物学功能	2
1.2 基因修饰 EPCs 在心血管疾病中的应用	2
1.3 讨论与展望	4
1.4 本论文主要创新性和研究意义	4
第二章 血管生成素-1 基因修饰内皮祖细胞移植在修复大鼠球囊损伤血管中的作用	6
2.1 实验材料	6
2.2 实验方法	7
2.3 实验结果	16
2.4 实验讨论	25
2.4 实验结论	28
参考文献	29
缩略语表	34
致 谢	35

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract.....	II
Chapter 1 introduction	1
1.1 Biological functions of Angiopoietin -1	2
1.2 The applications of gene-modified EPCs.....	2
1.3 Discusion and prospect.....	4
1.4 Content and signification	4
Chapte 2 The study of Angiopoietin -1 gene-modified EPCs transplantation in repairing rat balloon injury artery	6
2.1 Instruments and reagents	6
2.2 Experimental methods	7
2.3 Experimental results	16
2.4 Discusion	25
2.4 Conclusions	28
References	29
Abbreviation	34
Acknowledgement	35

第一章 前言

内皮损伤是动脉粥样硬化发生和发展的始动环节,血管内皮损伤和继发的修复不完全,是引起血管平滑肌细胞迁移和增殖的主要原因之一,也是经皮冠脉介入治疗(**percutaneous coronary interventions, PCI**)后支架内发生再狭窄的促发因素。随着近年来对干细胞研究的深入,发现骨髓来源的干细胞不仅参与个体出生后的血管新生和血管形成,而且有可能对损伤血管的内皮修复也有重要作用。外周血中存在骨髓来源的内皮前体细胞,又称为内皮祖细胞(**endothelial progenitor cell, EPC**), **EPC** 既能不断扩增,又能定向分化为成熟的内皮细胞^[1]。

由于 **EPC** 部分参与内皮损伤之后的修复,国外学者试图通过 **EPC** 移植来促进内皮修复从而预防动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄^[2]。不少学者已证实,用体外培养的 **EPC** 能帮助血管内皮损伤后的恢复,为 **PCI** 术后再狭窄的防治提供临床应用的可能^[3]。但是经体外培养扩增的 **EPC**,其归巢到损伤局部的能力下降,限制了疗效。同时,由于 **EPC** 的绝对数目相对较低,临床应用存在极大障碍。此外, **EPC** 的功能活性还受到年龄^[4]、糖尿病^[5]、高血脂^[6]等因素的影响。

近年来随着基因工程技术的成熟,基因治疗为血管损伤性疾病的治疗提供了新的思路。以往的研究大多使用逆转录病毒和腺病毒作为载体。但各自都存在着种种缺陷。慢病毒载体具有可感染分裂细胞及非分裂细胞、转移基因片段容量较大、目的基因不易诱发宿主免疫反应、表达时间长等优点,已成为当前基因治疗中的首选载体^[7]。

1.1 血管生成素-1的生物学功能

血管生成素-1(**Angiopoietin-1, Ang-1**) 是血管生成素家族之一,也是一类重要的血管生长因子。在成年动物中, **Ang-1** 主要分布在肌肉、卵巢、子宫等富含血管的组织中,其表达受缺氧、转化生长因子- β (**TGF- β**)、表皮生长因子(**EGF**)等的调控。它能特异性的地作用于内皮细胞,参与血管生成的调控过程,抑制细胞凋亡,促进内皮细胞出芽,稳定血管,降低血管通透性,在引导血管生长,促进损伤修复中起重要作用^[8]。**Ang-1**通过干预内皮细胞、平滑肌细胞和周细胞之间的相互作用促进血管生成和重塑,并提高内皮细胞的存活力^[9]。因此, **Ang-1**

基因治疗在防治血管狭窄和动脉粥样硬化方面具有良好的应用前景。

1.2 基因修饰EPCs在心血管疾病中的应用

EPCs 具有较强的自我更新能力, 较高的增殖潜能及缺血区定向归巢等特性, 同时, EPC 是最接近于血流的一层细胞, 释放出的活性物质很容易通过血流扩散到全身发挥广泛的作用, 因此 EPCs 是基因治疗理想的导向载体^[10]。从脐带血或自身骨髓, 外周血中分离 EPCs, 体外扩增后转染相关功能基因再向体内输注, 则可同时进行定向基因治疗和细胞治疗, 这将成为理想的血管内皮再生疗法。在基因与细胞联合治疗中, 细胞不仅作为外源基因的载体和表达场所, 同时自身也发挥治疗作用。

1.2.1 EPCs 基因治疗在血管损伤后修复中的作用

VEGF 基因治疗促进缺血组织血管新生已取得较大的进展。不少体内实验证实了它与 EPC 细胞在治疗上有协同性。将 VEGF 基因转染 EPC, 利用两者双重协同作用, 转染后 EPC 分泌 VEGF 显著增加, 同时 EPC 不但数量增加, 其分化、增殖、黏附性以及和内皮细胞单层的结合能力均可增强^[11]。Xu^[12]等将转染 VEGF165 基因的自体骨髓单个核细胞注射于急性心肌梗死兔的心肌内, 结果显示, VEGF165 转染组的心脏功能较单纯 EPC 移植组有更显著的提高, 且梗死部位中移植分化成为心肌细胞和内皮细胞也显著多于单纯 EPCs 移植组。最近也有国内研究者将 VEGF, Ang-1, aFGF 等基因修饰的 EPCs 应用于治疗性血管新生的研究。Meng^[13]等将腺病毒介导的 VEGF165 转染的 EPCs 进行移植可提高其移植存活率和增加静脉血栓再通率。另一实验也表明同时将 VEGF165 和 Ang-1 基因转入 EPCs 中, 转染后的 EPCs 具有更强的促血管再生能力^[14]。内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 基因产物对血管壁产生多效的细胞保护作用, 可减少氧化应激, 调节血管张力, 抑制血栓形成和平滑肌细胞的增殖迁移, 阻止动脉粥样硬化的发生。Kong 等在自体 EPCs 成功移植治疗颈动脉球囊损伤兔的实验基础上, 将携带 eNOS 基因的 EPCs 再移植到该动物模型中, 促进了损伤内膜的迅速重建, 显著抑制了新生内膜的异常增生并减少了血栓的发生, 新生内膜 (新生内膜/血管中膜) 抑制率达 72.1%。He 等也发现 eNOS 基因修饰的 EPCs 促进球囊损伤后血管再内皮化的能力比未转染的 EPCs 显著增强^[15]。以上研究均说明同时进行基因治疗和细胞移植治疗, 可

有效地促进血管新生, 改善缺血器官血流和功能。

1. 2. 2 EPCs 基因治疗在冠脉支架植入术后再狭窄的应用

随着 PTCA 和冠状动脉内支架植入术治疗冠心病的广泛开展, 术后支架内血栓形成和再狭窄是亟待解决的临床问题, 但目前尚无很好的防治方法。PCI 作为一项成熟的技术已广泛应用于冠心病的临床治疗。但 PCI 后再狭窄是影响疗效的主要原因。药物支架如雷帕支架虽可使再狭窄率大大降低, 但仍无法完全避免再狭窄发生。George 等^[16]取得充分证据证实支架内的快速内皮增生部分地与损伤的内皮有关, 且这是由 EPCs 的数量或其功能降低造成的。Aoki 等^[17]运用血管造影技术观察种植了 EPCs 的支架置入冠状动脉患者体内后, 不锈钢支架是否迅速内皮化, 从而抑制支架内血栓的形成和减少再狭窄率, 证明种植了 EPCs 的冠状支架对治疗新生冠状动脉疾病是安全的和可行的。最近 Walter 等^[18]研究发现, 将 VEGF-2 基因洗脱的支架植入高胆固醇血症兔的冠脉中, 3 个月后利用血管内超声分析内腔横断面积, 结果显示 phVEGF-2 基因洗脱支架组的血管再内皮化所需时间明显缩短, 内膜增生程度减轻, 进一步支持了支架植入 EPCs 以预防支架内血栓形成和再狭窄的可能性。

1. 2. 3 细胞移植的途径

在治疗心肌疾病的动物实验中, 移植途径包括经冠脉注射, 心肌内注射和经外周血管注射, Grøgaard 等^[19]把 PKH67 标记的 EPCs 分别经冠脉和外周血管输入猪冠脉损伤再灌注模型中, 术后 4-5 d, 荧光显微镜检测发现冠脉注射组心肌内 EPCs 数量较外周血管注射组明显增多[两组分别为 (3.2 ± 0.55) cells/high-power field 和 (0.33 ± 0.17) cells/high-power field], 而在脾脏、肺脏、肠系膜淋巴结、骨髓等其他组织中, 冠脉注射组 EPCs 数量较少, Qian 等^[20]把鼠骨髓来源 BrdU 标记的 EPCs 分别经冠脉注射和心肌内注射的方法输入小鼠体内, 免疫组化检测发现冠脉注入组心脏 EPCs 密度是心肌注射组的两倍多[两组分别为 $(0.20 \pm 0.03) / \text{mm}^2$ 和 $(0.08 \pm 0.01) / \text{mm}^2$, $P < 0.05$], 冠脉组心脏内分布更加均匀, 术后 3d 心脏内仍能检测到标记的 EPCs。以上实验证实冠脉注射法移植 EPCs 治疗效果更好, 而且不良反应比较小, 显示了较好的应用前景。研究发现移植细胞在缺血环境中容易死亡, 因此保护移植细胞在提高移植效率中非常重要, Tara 等^[21]发现通过转导一种人工抗细胞凋亡蛋白 (PTD-FNK) 能明显增加移

植细胞存活率, 增强移植效果。

而在球囊内皮损伤动物模型的实验中, Tongrong He^[22]等将事先造成球囊损伤的一段动脉血管夹闭, 随后将内皮祖细胞的悬液注入到这段暂时停止血流的血管腔中, 使其在局部与受损内膜充分反应, 最后恢复血流。甚至在 Zhan-Long Ma^[23]的研究中, 将由 Fe₂O₃ - PLL 该超顺磁性氧化铁标记的内皮祖细胞移植入目标血管处, 而这种新技术也有利于内皮祖细胞保存在受伤血管处, 增强移植效果。

1.3 讨论与展望

近年来, EPCs 移植的应用主要为缺血下肢和缺血心肌的促血管新生治疗研究, 以及损伤血管, 人工血管和带膜支架的内皮化研究等。实验证明, EPCs 移植可显著改善缺血部位的血流量、增加毛细血管密度、促进功能的恢复^[24], 并在损伤血管、人工血管和带膜支架的内皮化防止再狭窄中发挥积极的作用。但尚存在一些问题需要解决, 如体外扩增数量有限、鉴定和纯化技术尚不成熟以及移植的最佳途径和量尚未明确, 以及治疗性血管发生是否有促使潜在肿瘤的生长和血管瘤的出现等潜在危害也未清除。此外, 研究表明, 老年冠心病和糖尿病患者的循环血中 EPCs 数量下降, 迁移能力受损^[25-26]。有报道称 EPCs 数量与冠心病 Framingham 危险因素积分成反向线性关系, 高危者 EPCs 更易老化^[27]。这些患者的自体 EPCs 移植可能效果不佳, Heeschen 等^[28]的研究证实了这一点。因此如何在体外提高这类患者的 EPCs 的增殖能力、功能、生存时间, 使移植体内后能充分发挥治疗作用, 成为这类患者自体移植 EPCs 治疗心血管疾病的关键。EPCs 促血管新生作用的实验目前多在动物模型上进行, EPCs 移植的临床阶段目前限于: 严重的肢体缺血, 例如动脉硬化或 Burger 疾病。不能施行经皮导管介入 (PCI) 或冠脉旁路移植 (CABG) 治疗的心肌梗死。覆盖血管移植物, 促进生物适应性: 而且其临床效果还不明朗, 所以, 还要对 EPCs 的生物学特性和临床应用进行更多研究, 并且, 采用人为的方法, 将基因与 EPC 治疗结合起来, 也为提高 EPC 的增殖、动员、融合等能力方面提供新的技术支持。

1.4 本论文创新性和研究意义

本研究主要内容是将采用慢病毒载体介导 Ang-1 基因修饰 EPCs 以获得高表达 Ang-1 的 EPCs (Ang-1-EPCs), 并以此通过血管外膜注射移植到动脉球囊损伤

模型的大鼠中，而后利用荧光标记 CD34 流式细胞技术及 ELISA 方法检测移植干预对外周血系统利于内皮修复指标（CD34 阳性细胞和 Ang-1）的影响，并通过 HE、PCNA 免疫组化等病理学方法观察其对内膜、中膜平滑肌细胞增殖的抑制，免疫荧光染色观察 EPCs 局部注射迁移和分化情况，Real-Time PCR 定量分析股动脉组织中 Ang-1/Tie-2 的 mRNA 含量，进而说明 Ang-1 在协同 EPC 修复损伤血管中的作用，也为动脉血管狭窄的基因治疗和细胞治疗提供理论基础和实验依据。

第二章 血管生成素-1 基因修饰内皮祖细胞移植在修复大鼠球囊损伤血管中的作用

2.1 实验材料

2.1.1 细胞、实验动物

EPC 细胞：本课题组分离培养；

SPF 级雄性 SD 大鼠，体重 400–500g，上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

2.1.2 主要试剂

- 1、苏木素伊红染色试剂盒（福州迈新）
- 2、PCNA 一抗（武汉博士德）
- 3、山羊抗兔免疫组化染色试剂盒（北京中杉金桥）
- 4、Rabbit polyclonal to Von Willebrand Fact (Abcam)
- 5、RbIgG/TRITC (Abcam)
- 6、Antifade Solution (Applygen Technologies)
- 7、Thunderbird SYBR Qpcr Mix
- 8、ELISA Kit for Rat Angiopoietin-1 (Uscn)
- 9、荧光标记小鼠单克隆抗体 CD34-FITC (Santa Cruz)
- 10、动脉取血栓 2F 导管 (Edward)

2.1.3 主要仪器

- 1、全自动病理组织分析脱水仪（Sakura 公司）
- 2、组织包埋机（Thermo 公司）
- 3、石蜡切片机（Thermo 公司，型号 HM315）
- 4、组织摊片机（德国 LEICA 公司，型号 HI1220）
- 5、电热恒温干燥箱（上海齐欣，型号 DHG-9203A）

- | | |
|---------------|-------------------|
| 6、光学显微镜 | (Leica, 型号 DM25) |
| 7、倒置显微镜 | (上海, 型号 37XB) |
| 8、荧光显微镜 | (日本 Nikon) |
| 9、酶标仪 | (TECAN) |
| 10、荧光定量 PCR 仪 | (美国 ABI) |
| 11、流式细胞仪 | (BECKMAN COULTER) |
| 12、扫描电镜 | (Jsm63901) |

2.2 实验方法

2.2.1 EPCs 的采集、分离

取 100-120g 的雄性 SD 大鼠, 以 10% 水合氯醛 (0.4ml/100g) 腹腔注射麻醉以手术镊钳夹大鼠后肢无回缩反应判断为麻醉深度合适, 将大鼠仰卧固定于手术台上, 常规备皮, 碘伏消毒, 无菌条件下取出双侧股骨和胫骨。以冷 PBS 反复冲洗骨髓腔至冲洗液清亮, 轻柔吹打混匀细胞悬液, 缓慢叠加于 Histopaque-1077 细胞分离液液面之上 (分离液与细胞悬液比例为 1: 2), 将离心管缓慢移入水平离心机, 2300rpm 20℃ 下离心 20 分钟。离心后液体分为四层, 小心吸取白絮状细胞层即单个核细胞层, 加入 4 倍体积的 PBS, 1500rpm 5 分钟离心洗涤两次。

2.2.2 EPCs 的体外培养、扩增

离心后弃上清, 加入 EGM-2-MV 内皮细胞培养基, 将细胞充分吹打混匀后计数, 调整细胞密度, 以 5×10^5 个/cm² 密度将细胞接种于塑料培养皿中, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育。4 天后首次换液, 弃去未贴壁细胞继续培养, 以后每 3 天换液 1 次, 并于倒置显微镜下观察细胞贴壁及形态变化, 待细胞达到 90% 融合时, 以 0.25% 1ml 胰蛋白酶消化细胞, 室温孵育 6-7 分钟, 大部分细胞皱缩变形后终止消化, 轻轻吹打细胞, 1000rpm 离心 10 分钟, 待细胞沉淀用 EGM-2-MV 培养基重悬并吹打为单细胞悬液, 将细胞进行 1: 2 传代。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库